

アミノカラムを用いたガラクトン酸と 中性糖類の HPLC による同時分析

吉野世美子

Simultaneous analysis of galacturonic acid and neutral sugars
by a HPLC method with amino column

Yomiko Yoshino

The method for simultaneous analysis of galacturonic acid and neutral sugars which constitute pectic substances was examined by HPLC analysis using the amino column (Shodex Asahipak NH2P-50). The temperature of column was 40°C and the refractive index detector was used. This method using 95% acetonitrile solution including 1.75% phosphoric acid allowed to clearly separate galacturonic acid, glucose, galactose, arabinose, mannose, rhamnose, xylose, fucose and ribose with glycerol as an internal standard.

(Received September 12, 2005)

1. はじめに

ペクチン質はガラクトン酸を主鎖とし、側鎖に種々の中性糖の結合部分を持つ複合多糖類と考えられている。近年、ペクチン質を構成する糖類を定量する方法として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が用いられるようになり、Voragen ら¹⁾は種々のイオン交換カラムを用いて、飽和と不飽和のガラクトン酸のオリゴマーの分離法を示した。また松橋ら²⁾は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてペクチン質中に含まれるガラクトン酸と中性糖類を同時に定量する方法を示した。この方法では、中性糖類はガラクトン酸から完全に分離して、ひとつのまとまったピークとして検出されるのでガラクトン酸と中性糖類の総量としての比率を測定するには非常に有効な手法であるが、それぞれの中性糖の構成比は測定できない。そこで、中村ら³⁾は、糖がホウ酸と容易に結合し、陰イオン性錯イオンを形成する性質を利用して作られたカラムを用いてペクチン質に含まれる 7 種類の中性糖の単糖を分離する方法を示した。しかしこの方法ではペクチン

質に含まれる中性糖 7 種は分離できるが、酸性糖であるガラクトン酸はピークとして検出することはできなかった。そのためペクチン質中のガラクトン酸と中性糖類のそれぞれの構成比を測定するためにはまず松橋ら²⁾の方法でガラクトン酸と中性糖類の比率を求め、さらに中村ら³⁾の方法を用いて、ガラクトン酸を除去した試料で再分析する必要がある。Garna ら⁴⁾はペクチン質に含まれるガラクトン酸と中性糖類を同時に分析、定量するため、陰イオン交換カラムを用いた HPLC 分析により、ガラクトン酸とフコース、アラビノース、ラムノース、ガラクトース、グルコース、キシロース、マンノースの中性糖 7 種と内部標準物質としてグルクロン酸またはデオキシグルコースの分離を試みた。しかし、この方法では中性糖類は初期溶離液で分離できるが、ガラクトン酸とグルクロン酸は吸着するので、これらの酸性糖を溶出するためには溶離液を変えてグラジエント溶出する必要がある、非常に分析が煩雑であった。このようにペクチン質の構成糖類を分析する方法として、様々な方法が試みられたが、ガラクトン酸である酸性糖と多数の中性糖類のそれぞれを同時にイソクラティックに分離定量する方法はまだ見つかっていない。そこで筆者は、ア

ミノカラムを用いた HPLC 分析で、ペクチン質を構成する酸性糖と中性糖の同時分析を試み、成果が得られたので報告する。

II. 実験方法

1. 試薬の調製

糖類

ペクチン質を構成する酸性糖として、ガラクトロン酸、中性糖類としてはグルコース、アラビノース、ガラクトース、マンノース、ラムノース、キシロース、フコースの 7 種類とリボース、内部標準物質としてグリセロール、ソルビトールの 2 種類を用いた。これらの糖類の単独分析にはそれぞれの糖類の 1% 水溶液を用いた。また、分離実験には中性糖類の混合液としてガラクトロン酸、中性糖 7 種、リボース、内部標準液としてグリセロールまたはソルビトールの 10 種類をそれぞれ 1% ずつ含む水溶液を用いた。

溶離液

使用した溶離液は①から⑦である。

① 0.02M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) は磷酸第一カリウムと磷酸第二ナトリウムで調製した。

② ホウ砂—ホウ酸緩衝液

0.05M ホウ砂—0.2M ホウ酸緩衝液 (pH8, pH9) および 0.1M ホウ砂—0.4M ホウ酸緩衝液 (pH8, pH9) を使用した。

③ 0.1M 磷酸第一カリウムを含む 5% メタノール溶液

④ 0.1M 酢酸ナトリウムを含む 50% メタノール溶液

⑤ 酢酸を含むアセトニトリル溶液

0.05M ~ 0.2M 酢酸を含む 75 ~ 80% アセトニトリル溶液を使用した。

⑥ 酢酸アンモニウムを含むアセトニトリル溶液

0.1M ~ 0.2M 酢酸アンモニウムを含む 60 ~ 70% アセトニトリル溶液を使用した。

⑦ 磷酸を含むアセトニトリル溶液

1 ~ 2% 磷酸を含む 80 ~ 95% アセトニトリル溶液 (磷酸 10 ~ 20.0g を量り取り、少量のメンブレン水で希釈し、アセトニトリル 800 ~ 950ml と混合後、メンブレン水で 1000ml とした) を用いた。

試薬はすべて和光純薬製の特級または分析用を用いた。

2. HPLC 分析の条件

HPLC 分析に用いたカラムは Shodex Asahipak NH2P-50 4E カラム (昭和電工株式会社製: 4E; 4.6×250mm にプレカラム NHP2P-50G 4A; 4.6×10mm を連結), 分析機器はすべてウオーターズ製で、ポンプは 600E, サンプルの注入は 717 オートサンプラー、

検出器は示差屈折計 (RI410), カラムの温度設定はカラムオープン, 記録は 805 データステーションを用いた。HPLC 分析には各糖の 1% 溶液または混合液を 20μl, カラム温度は 30 ~ 50°C, 分析時間は 180 分, 流速は 0.5ml/min とした。

III. 結果と考察

1. 溶離液①から⑥を用いた分析結果

溶離液溶液①から⑥を用いた分析結果を表 1 に示した。0.02M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) で分析するとガラクトロン酸と中性糖類のピークは検出できたが、各中性糖類は分離することはできなかった。②ホウ砂—ホウ酸緩衝液の分析では pH8 と 9, カラム温度 40°C, 50°C いずれの組み合わせにおいても全くピークを検出することはできなかった。また③ 0.1M 磷酸第一カリウムを含む 5% メタノール溶液, ④ 0.1M 酢酸ナトリウムを含む 50% メタノール溶液のいずれにおいてもピークは全く検出できなかった。次に⑤酢酸を含むアセトニトリル溶液を検討した結果, カラム温度 30 ~ 40°C においては中性糖類のピークは検出できたがガラクトロン酸はピークを示さなかった。⑥酢酸アンモニウムを含むアセトニトリル溶液を用いた分析結果では酢酸アンモニウム 0.1 ~ 0.15M では中性糖類のピークは検出できたが, 0.2M では中性糖類を検出することはできなかった。またガラクトロン酸はいずれの酢酸アンモニウムを含むアセトニトリル溶液でも検出はできなかった。

2. 磷酸を含むアセトニトリル溶液を用いた分析結果

予備実験の結果, アセトニトリルの濃度が低いと分析時間が短くなり糖類が接近して溶出するので分離が悪いことがわかった。また磷酸の負のピークに吸収されて検出できない糖類も増えることがわかった。カラム温度が高くなるとリテンションタイムは早くなる傾向にあった。アセトニトリルの濃度を高くするとリテンションタイムが遅くなり, 糖類の分離は良くなるが, サンプルは水溶性であるのでアセトニトリルが高濃度になると不溶化してしまう。これらの傾向を考慮して磷酸は 1% から 2% まで, アセトニトリルは 80% から 95% まで濃度を上げていき, すべての中性糖が分離できる条件を検討した。カラム温度は 30, 40, 50°C とした。以上の条件で分析した糖類の分析結果を表 2 に示した。

1% 磷酸—80% アセトニトリル溶液でそれぞれの糖溶液を単独で分析した結果, ガラクトロン酸とガラクトースの溶出時間が重なり, フコースとリボースの溶出時間も重なることがわかった。またマン

表 1 Results of HPLC separation of neutral sugars and galacturonic acid

HPLC conditions				Results	
Mobile phase	pH	Temperature(°C)	Detector	Neutral sugars	Galacturonic acid
0.02M Phosphate buffer	7.0	40	RI	Not separated	Detected
0.05M Na-borate-0.2M borate	8.0	40	RI	No	No
0.05M Na-borate-0.2M borate	8.0	50	RI	No	No
0.05M Na-borate-0.2M borate	9.0	40	RI	No	No
0.05M Na-borate-0.2M borate	9.0	50	RI	No	No
0.10M Na-borate-0.4M borate	8.0	40	RI	No	No
0.10M Na-borate-0.4M borate	8.0	50	RI	No	No
0.10M Na-borate-0.4M borate	9.0	40	RI	No	No
0.10M Na-borate-0.4M borate	9.0	50	RI	No	No
0.10M K-phosphate-5% Methanol	10.5	30	RI	No	No
0.10M Na-acetate-50% Methanol	4.5	40	RI	No	No
0.05M Acetic acid-75% Acetonitrile	3.4	30	RI	Not separated	No
0.10M Acetic acid-75% Acetonitrile	3.2	30	RI	Not separated	No
0.10M Acetic acid-75% Acetonitrile	3.2	40	RI	Not separated	No
0.10M Acetic acid-80% Acetonitrile	3.1	30	RI	Not separated	No
0.20M Acetic acid-80% Acetonitrile	3.1	30	RI	Not separated	No
0.20M Acetic acid-80% Acetonitrile	3.1	50	RI	No	Detected
0.15M NH ₄ -acetate-60%Acetonitrile	7.8	30	RI	Not separated	No
0.10M NH ₄ -acetate-70%Acetonitrile	7.9	30	RI	Not separated	No
0.20M NH ₄ -acetate-70%Acetonitrile	7.9	30	RI	No	No

Not separated ; Peak was detected, but overlapped. No; Peak was not detected.

ノースは負のピークに吸収されて検出できなかった。1.5% 磷酸－85% アセトニトリル溶液では分析時に最も溶出時間の早いラムノース、およびラムノースに続いて溶出時間の早いフコース、リボースの溶出時間は測定できたが、ピークの一部が負のピークに吸収されるため、正確には検出できなかった。アセトニトリルを 90% に上げるとフコースとリボースは分離できるようになるが、ラムノースと内部標準物質のグリセロールは負のピークに吸収され、検出できなかった。アセトニトリルの濃度を 93% に上げると分離はさらに良くなるが、グリセロールを内部標準物質に使用するとラムノースのピークと重なって負のピークに吸収されてしまう (図 1)。またソルビトールを内部標準物質に使用すると溶出時間が遅く、他の糖と重ならないのでラムノースとの重なりは避けられるが、負のピークへの吸収は避けられない (図 2)。さらにアセトニトリルの濃度を上げ、1.75% 磷酸－95% アセトニトリル溶液で分析した結果、内部標準物質のグリセロールを含むすべての中性糖類と酸性糖であるガラクトン酸を同時に分離することができた (図 3)。

Nozal ら⁵⁾ はワイン中の糖類を分析するためホウ酸

イオン交換体である AminexA-25 カラムを用いて分離を試みた。この方法は溶離液にエタノールアミンを含むホウ酸緩衝液を用い、ホウ酸イオン交換体のカラムから溶出した糖類を 140 度で発色させて検出するという点で中村ら³⁾ の方法と同じであるが、検出器に蛍光検出器を用いた点で異なる。中村ら³⁾ は検出器として UV 検出器を用いており、比較的安価で取り扱いやすいという利点があった。しかし、Nozal ら⁵⁾、中村ら³⁾ のいずれの方法においても、中性糖類を分離することはできたが、酸性糖を分離することはできなかった。ガラクトン酸のみを分析するのであれば、酸性糖である特性を生かしてイオン交換体を用いればオリゴマーを分離することも可能であるが⁶⁾、イオンを持たない中性糖類の分離は困難である。Wunschel ら⁷⁾ は細菌の細胞壁の加水分解物を陰イオン交換カラムを用いた HPLC 分析で分離を試みたが細胞壁の酸性糖と中性糖の分離解析にはグラジエント溶出と多重スペクトル検出器が必要であり、分析が非常に煩雑かつ高価な機器が必要であった。また、Tikhomirov ら⁸⁾ もイオン交換体を用いた HPLC 分析で、アミノ酸、アミノ糖、中性糖類の分離を試みたが、この方法でもサンプルの混合液

表2 Analytical conditions of HPLC and retention times of sugars

Eluent		pH	Column Temp. (°C)	Samples		Retention time(min)									
Phosphoric Acid (%)	Aceto- nitrile (%)			Single or mixture	Galacturonic Acid	Neutral sugars								Internal standards	
						Glu	Gal	Ara	Man	Rha	Xyl	Fuc	Rib	Gly	Sor
1.0	80	1.3	30	Single	20.83	18.29	20.98	14.63	ND	10.90	12.60	11.94	11.38	—	—
1.5	85	1.1	30	Single	25.12	28.37	32.70	20.37	25.05	12.05a	16.95	15.90a	13.37a	11.62	—
2.0	85	1.0	30	Single	24.67	27.12	32.02	20.08	25.77	11.63a	16.45	15.27a	14.75a	11.83a	—
1.75	88	1.0	30	Single	30.38	34.78	40.92	23.22	30.63	ND	18.97	17.55	16.33a	ND	40.28
			30	Mixture	ND	33.13	39.77	22.85	30.12	ND	18.72	17.52	16.15a	—	—
			40	Mixture	ND	31.62	37.25	21.75	28.78	ND	18.08	16.82	15.75a	—	—
			50	Mixture	31.52	29.18	33.85	19.98	26.63	11.82a	17.05	ND	ND	—	—
1.5	90	1.1	30	Single	37.83	45.80	54.80	28.35	40.08	ND	22.57	20.78	18.78	ND	55.47
			30	Mixture	ND	43.62	55.35	27.95	39.25	ND	22.23	20.77	18.58	—	—
			40	Mixture	ND	41.23	49.38	26.67	37.25	ND	21.35	19.78	17.92	—	—
			50	Single	30.98	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1.75	90	1.0	30	Single	38.50	47.90	57.97	29.45	42.08	16.55a	23.10	21.42	19.22	ND	59.98
			30	Mixture	ND	46.00	56.62	29.02	41.37	16.37a	22.77	21.37	19.03	—	—
			40	Mixture	35.48	43.33	52.33	27.50	39.03	ND	21.88	20.42	18.32	—	—
			50	Mixture	ND	38.80	45.67	24.48	35.30	ND	20.13	18.40	17.03	—	—
2.0	90	1.0	30	Single	35.38	43.48	52.83	27.62	38.70	15.75a	21.83	20.27	18.35	15.90a	53.48
			30	Mixture	ND	41.40	50.93	27.15	37.43	ND	21.32	20.18	18.15	ND	53.26
1.75	93	0.9	40	Single	42.80	58.00	70.33	33.47	51.55	18.30a	26.15	23.88	21.47	18.63a	74.53
			40	Mixture	42.98	56.75	69.40	32.98	50.97	17.88a	25.90	23.73	21.30	—	75.13
			40	Mixture	42.75	56.12	68.38	32.87	50.52	18.05ab	25.82	23.78	21.35	18.60ab	—
1.75	95	0.9	40	Single	46.72	74.38	88.41	39.18	66.88	20.49	30.65	28.41	24.45	22.78	—
			40	Mixture	46.71	72.76	87.29	38.64	65.65	20.35	30.28	28.23	24.36	22.79	—

— : Not analyzed, ND: Not detected, a: peak is absorbed into the negative peak, b: peaks are overlapped

Glu: glucose, Gal: galactose, Ara: arabinose, Man: mannose, Rha : rhamnose, Xyl: xylose, Fuc: fucose, Rib: ribose

Gly: glycerol, Sor: sorbitol

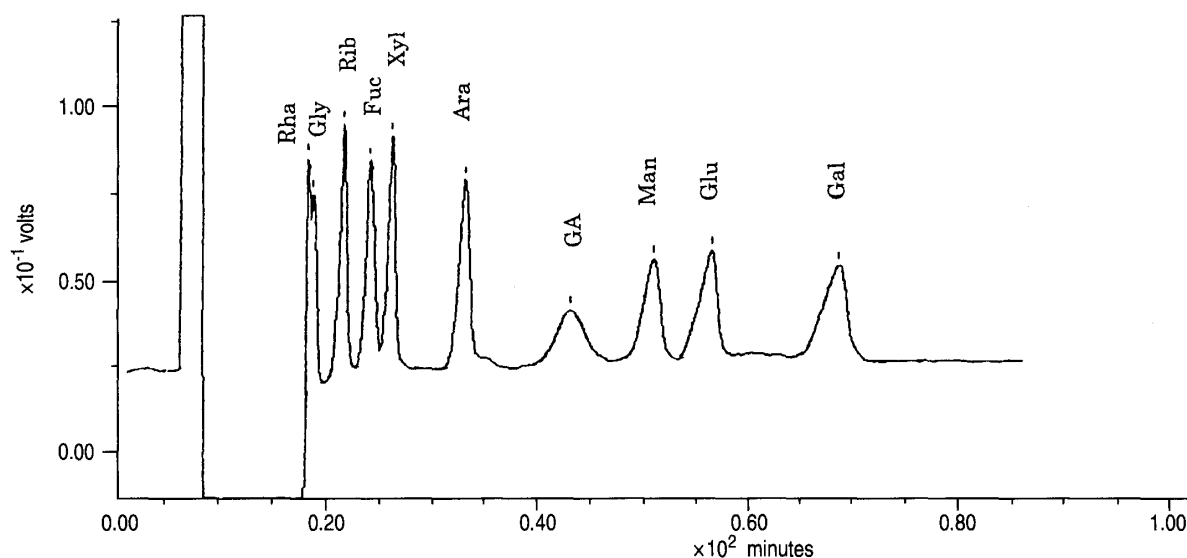


図 1 HPLC chromatogram of a standard mixture of sugars
Mixture of sugars containing galacturonic acid (GA), glucose (Glu), galactose (Gal), arabinose (Ara), mannose (Man), rhamnose (Rha), xylose (Xyl), fucose (Fuc), ribose (Rib), were eluted with 1.75% phosphoric acid-93% acetonitrile solution with glycerol (Gly) as an internal standard.

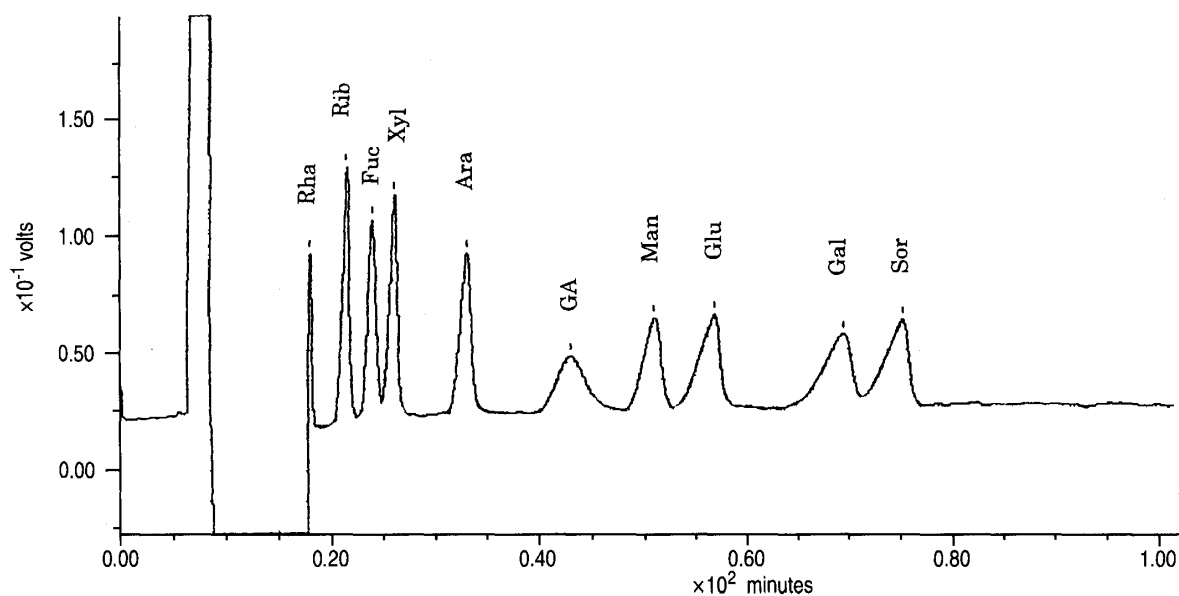


図 2 HPLC chromatogram of a standard mixture of sugars
Mixture of sugars as described in Fig. 1 were eluted with 1.75% phosphoric acid-93% acetonitrile solution with sorbitol (Sor) as an internal standard.

の分離には 2 種類のカラムに一回ずつ通した後、再度ははじめのカラムに通さなければならないので、合計 3 回のカラム分析に 15 段階の異なる溶出が必要であり、汎用的な方法とはいえない。Wei ら⁹⁾ は初めてアミノカラムを用いてアセトニトリル水溶液または磷酸ナトリウムを含むアセトニトリル溶液 (pH 7 付近) で、ガラクトン酸とグルクロン酸の酸性糖と、ラムノース、キシロース、フコース、アラビ

ノース、マンノース、グルコース、ガラクトース、シュクロース、ラクトースの分離を試みた。この研究で Wei ら⁹⁾ は中性糖類が持つ水酸基の配置と数分離の重要な因子になり、単一の液相では一般に、水酸基の数が多いほど水素結合が強くなるので、分離時間は遅くなるという Amboise ら¹⁰⁾ の仮説を検証した。この仮説に従うとガラクトン酸はガラクトースの 6 位の水酸基がカルボキシル基に置き換

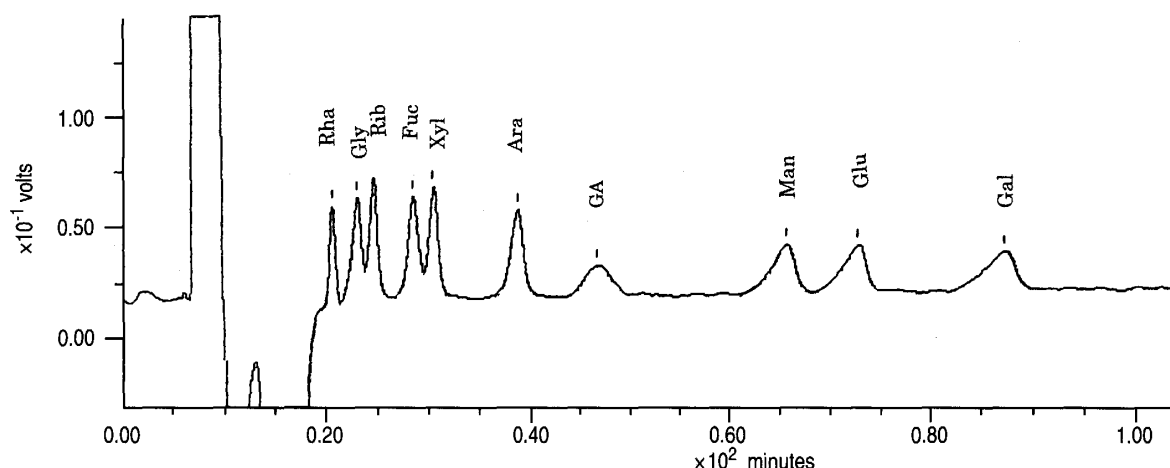


図3 HPLC chromatogram of a standard mixture of sugars

Mixture of sugars as described in Fig.1 were eluted with 1.75% phosphoric acid-95% acetonitrile solution with glycerol (Gly) as an internal standard.

わっているので水酸基の数が少なく、ガラクトースよりも早い時間に溶出されるはずであるが、得られた結果はカラムに強く吸着して、溶出されなかった。またガラクトースを含む中性糖類は溶出されたが溶離時間が重なって完全に分離することはできなかった。このことから Wei ら⁹⁾は Amboise ら¹⁰⁾の仮説を否定し、酸性糖の溶出には溶離液や様々な分子の力が影響を与えるとしている。本研究で用いた NH カラムは親水性ポリマーにアミノ基を導入したカラムで、分配と吸着モードにより単糖、オリゴ糖、糖アルコールの分離に使用でき、主にアセトニトリル水溶液を移動相に用いて分析し、アセトニトリルの濃度が高いほど各種糖類の保持が高くなるとされる。このことから、電荷を持たない中性糖類がアセトニトリルの濃度を上げることによりカラムでの吸着時間が長くなり、分離が可能となったと考えられるが、五糖類、六糖類、糖アルコール類（内部標準物質）の間に、明確な相違はみられず、溶出の原理の解明には更なる研究が必要と考えられる。本研究法は使用したアミノカラムが化学的に安定で安価であり、水溶液でも有機溶媒でも使用できる点、また検出器が汎用性のある示差屈折計である点で有用な手法と考えられる。またペクチン質を構成する酸性糖と中性糖類という荷電状態の異なる多数の糖類をアミノカラムを用いて初めて同時にイソクラティックな溶離液で分離した点で非常に意義があると考えられる。

IV. 要 約

本研究ではアミノカラムを用いた HPLC 分析によ

りペクチン質を構成するガラクトン酸と中性糖類を同時に分離する方法を検討した。その結果、ショウデックスアサヒパック NH2P-50 4E カラムの温度を 40°C とし、1.75% 磷酸を含む 95% アセトニトリル溶液で溶出し、示差屈折計で検出することによりガラクトン酸と中性糖類であるグルコース、ガラクトース、アラビノース、マンノース、ラムノース、キシロース、フコース、リボース、および内部標準物質のグリセロールを完全に分離、検出することができた。

V. 謝 辞

本研究を実施するにあたり、アミノカラムを提供していただいた昭光通商株式会社鈴木廣志氏ならびに昭和電工株式会社に深謝致します。

(平成 17. 9. 12. 受付)

VI. 文 献

- 1) A.G.J. Voragen, H.A. Schols, J.A. De Vries and W. Pilnik: *J. Chromatography*, **244**, 327 (1982)
- 2) S. Matsushashi, S. Inoue and C. Hatanaka: *J. Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1053 (1992)
- 3) A. Nakamura, C. Hatanaka and Y. Nagamatsu: *J. Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 178 (2000)
- 4) H. Garna, N. Mabon, B. Wathélet and M. Paquot: *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4652 (2004)
- 5) M.J. Del Nozal, J.L. Bernal, F.J. Comez, A. Antolin and L. Toribio: *J. Chromatography*, **607**, 191 (1992)
- 6) R. G. Cameron, A. T. Hotchkiss, S. W. Kauffman

- and K. Grohmann: *J. Chromatography A.*, 1011, 227 (2003)
- 7) D. S. Wunschel, K. F. Fox, M. L. Nagpal, K. Kim, G. C. Stewart and M. Shahgholi: *J. Chromatography A.*, 776, 205 (1997)
- 8) M. M. Tikhomirov and A. Y. Khorlin: *J. Chromatography*, 167, 197 (1978)
- 9) Y. Wei and J. Fang: *J. Chromatography.*, 513, 227 (1990)
- 10) M. D. Amboise, D. Noel and T. Hanai: *Carbohydr. Res.*, 79, 1 (1980)